

СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛИПОСОМНОЙ ФОРМЫ И ВОДНОГО РАСТВОРА КСИМЕДОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИПОСОМНОЙ АНТРАЦИКЛИН-АЛКИЛИРУЮЩЕЙ КОМБИНАЦИИ КРЫСАМ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИЕЙ

¹Шиндяйкина В.С., ¹Сипров А.В., ¹Вашуркина И.М., ¹Зими́на М.Ю., ¹Романова Э.В.

¹ ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», Саранск, e-mail: alek-s13@mail.ru

Наряду с созданием новых лекарственных средств, в ряде случаев остается неполностью раскрытым терапевтический потенциал уже существующих, актуализируя эту тему. Цель: сопоставить воздействие ксимедона внутри липосом и его водного раствора на функциональное состояние печени при введении инкапсулированных в липосомы антрациклинового антибиотика доксорубина (4 мг/кг) и алкилирующего агента циклофосфамида (45 мг/кг) крысам с карциномой Уокер-256. В работе использовали 91 крысу Вистар (160-250 г). Цитостатические средства, заключенные в липосомальные наночастицы, вводили в вену через катетер однократно. Липосомную форму и водный раствор ксимедона использовали в двух дозах – 50 и 100 мг/кг массы животного внутривенно. Каждую дозу в соответствующей группе вводили сразу после применения липосомных цитостатических средств один раз в день в течение 5 дней. Оцениваемые параметры анализировали в двух временных точках после введения липосомных цитостатических средств – через 3 и 7 дней. Усиление дисфункции печени отчетливо наблюдается уже на 3 сутки после введения липосомных цитостатических средств. Липосомная форма, в отличие от водорастворимой, оптимизирует способность ксимедона (50 мг/кг) к улучшению функционального состояния печени, позволяя эффективнее корректировать показатели сывороточных аланиновой трансаминазы, гаммаглутамилтранспептидазы, лактатдегидрогеназы, альбуминов и общего билирубина после применения в липосомах цитостатических средств. Вторая доза вводимой липосомной формы ксимедона – 100 мг/кг – не показала гепатопротекторного превосходства над дозой 50 мг/кг.

Ключевые слова: липосомная комбинация цитостатиков, липосомный ксимедон, доза, функциональное состояние печени, крысы.

COMPARISON OF THE EFFECT OF LIPOSOMAL FORM AND AQUEOUS SOLUTION OF XYMEDON ON THE FUNCTIONAL STATE OF THE LIVER AT THE ADMINISTRATION OF LIPOSOMAL ANTHRACYCLINE-ALKYLATING COMBINATION TO RATS WITH EXPERIMENTAL NEOPLASIA

¹Shindyaikina V.S., ¹Siprov A.V., ¹Vashurkina I.M., ¹Zimina M.Y., ¹Romanova E.V.

¹ N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, e-mail: alek-s13@mail.ru

Along with the creation of a new drugs, in a number of cases the therapeutic potential of existing ones remains incompletely revealed, making this topic relevant. The aim: to compare the effect of xymedon inside liposomes and its aqueous solution on the functional state of the liver in rats with Walker-256 carcinoma after administration of the anthracycline antibiotic doxorubicin (4 mg/kg) and alkylating agent cyclophosphamide (45 mg/kg) encapsulated in liposomes. 91 Wistar rats (160-250 g) were used in the experiment. Cytostatic drugs encapsulated in liposomal nanoparticles were administered intravenously once. Two doses of liposomal form and aqueous solution of xymedon – 50 and 100 mg/kg of animal weight were used intravenously. Each dose of the substance was administered immediately after the use of liposomal cytostatic drugs once daily for 5 days in the corresponding group. The assessed parameters were analyzed at two time points after administration of the liposomal cytostatic combination – after 3 and 7 days. An increase in the liver dysfunction was detected, clearly observed already on the day 3 after the administration of liposomes with cytostatics. The liposomal form, in contrast to the water-soluble one, optimizes the capacity of xymedon (50 mg/kg) to improve the functional state of the liver. It allows to correct the indicators of serum alanine transaminase, gamma-glutamyl transpeptidase, lactate dehydrogenase, albumin and total bilirubin more effectively after the use of cytostatic drugs inside liposomes. The second dose of xymedon encapsulated in liposomes – 100 mg/kg – did not show a hepatoprotective advantage over the dose of 50 mg/kg.

Keywords: liposomal combination of cytostatics, liposomal xymedon, dose, functional state of the liver, rats.

Введение

В настоящее время использование липосомальных форм лекарственных средств успешно реализуется в различных областях медицинской практики – кардиологии, онкологии, дерматологии, неврологии и в то же время остается открытой темой для продолжения изучения и совершенствования таргетной терапии различных заболеваний [1, 2]. Основными преимуществами липосомальных форм лекарственных средств являются увеличение их биодоступности, биodeградируемость и иммунологическая нейтральность, а также целевой транспорт лекарств и достижение эффективной концентрации препарата в клетке-мишени при различных патологических состояниях [3, 4]. Сами липосомальные частицы рассматриваются как самостоятельные факторы коррекции патологических процессов за счет модификации фосфолипидного окружения ионных каналов, мембранных рецепторов и ферментов [5]. Учитывая, что простые липосомальные формы лекарств быстро удаляются из кровотока системой мононуклеарных фагоцитов с преимущественным накоплением в печени [6, 7], использование липосомальных форм цитостатиков может усиливать их гепатотоксичность [8]. Учитывая, что важную роль в реализации токсических свойств противоопухолевой терапии, в том числе гепатотоксичности, играет усиление свободнорадикальных процессов [9] и подавление пролиферативной активности «здоровых» клеток, актуальным представляется использование в качестве гепатопротектора ксимедона, обладающего антирадикальной активностью и способностью усиливать репаративные процессы [10, 11], а внедрение его в липосомы может усилить целевую доставку и защиту печеночных клеток от повреждения по сравнению с водорастворимой формой этого лекарственного средства.

Цель работы – сопоставить воздействие ксимедона внутри липосом и его водного раствора на функциональное состояние печени (активность аланиновой и аспарагиновой трансаминаз, гаммаглутамилтранспептидазы, лактатдегидрогеназы, уровень альбуминов, мочевины и общего билирубина в сыворотке крови) при введении липосомной «доксорубицин-циклофосфамид» комбинации крысам с карциномой Уокер-256.

Материалы и методы исследования

В работе использовали 91 крысу Вистар (самки, которые весили от 160 до 250 г.), содержащихся в стандартных условиях вивария «МГУ им. Н.П. Огарёва». С животными работали по правилам «Руководства по уходу и использованию лабораторных животных» (Guide for the care and use of laboratory animals) [12]. Взвесь опухолевых клеток Уокер-256 (10^6 клеток) инъецировали подкожно в проксимальную часть хвоста (№1 – группа контроля У-256). Использовали концентрат антрациклинового антибиотика доксорубина («Ebewe Pharma», Австрия), предназначенный для внутрисосудистого введения, который разводили на физрастворе до концентрации 0,04% и осуществляли внутривенную инъекцию (4 мг/кг массы

животного в боковую хвостовую вену) однократно на 11 день после моделирования неоплазии в сочетании с алкилирующим цитостатическим средством циклофосфамидом («Baxter oncology», Германия) в виде порошка, растворенного в физрастворе до концентрации 0,45% и вводимого (45 мг/кг) вслед за доксорубицином через катетер (№2 – группа с получением водного раствора доксорубицина и циклофосфамида – В «Д-Ц»). Липосомы, в которые совместно заключали цитостатические средства доксорубицин и циклофосфамид в аналогичных дозах (№3 – группа с получением доксорубицина с циклофосфамидом, заключенных в липосомальные наночастицы, – Л «Д-Ц»), готовили из лецитина и холестерина с последующей пассивной загрузкой цитостатиков (использовали роторный испаритель Heidolph (Германия) и экструдер LIPEX (Канада) и вводили так же, как водорастворимую комбинацию цитостатических средств. Оценку липосомных наночастиц проводили на спектрофотометре Shimadzu (Япония).

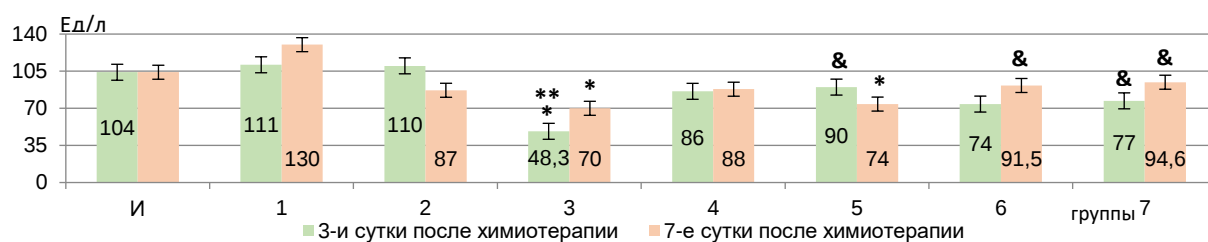
Ксимедон (субстанция, «Кристалл», Россия) использовали после растворения в физрастворе до концентрации 10% и инъектировали ежедневно в вену (50 либо 100 мг/кг) сразу после введения Л «Д-Ц» комбинации в течение 5 суток (№4 и 5 – группы с водным раствором ксимедона – ВРК 50/100 мг/кг соответственно).

Ксимедон внутри липосом с концентрацией 50 либо 100 мг/мл вводили в вену сразу после введения Л «Д-Ц» комбинации в тех же дозах, как его водный раствор, в течение 5 суток (№6 и 7 – группы с липосомной формой ксимедона – ЛФК 50/100 мг/кг соответственно). Таким образом, в эксперименте участвовало 7 групп животных (n=12), отдельную группу составили интактные крысы (И, n=7).

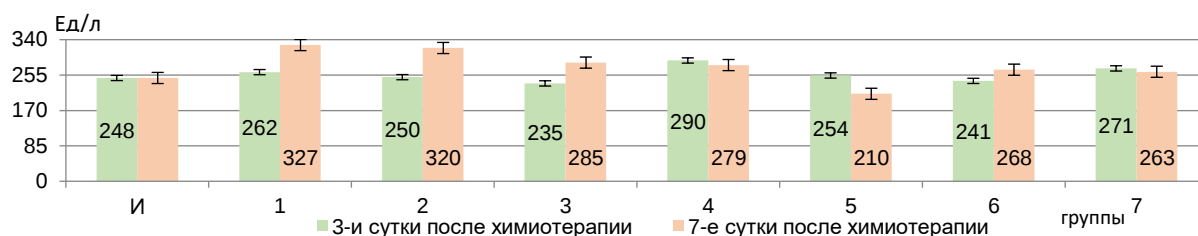
После введения противоопухолевой комбинации на 3 и 7 сутки 6 особей животных из каждой группы подвергали эвтаназии под общей анестезией зоветилом и рометаром. Использовали сыворотку крови, в которой оценивали активность аланиновой и аспарагиновой трансаминаз (АЛТ и АСТ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), концентрацию альбуминов и мочевины, уровень общего белка и билирубина на автоматическом биохимическом анализаторе BS-480 Mindray (КНР). Статобработку проводили с расчетом средних арифметических значений (М) и их ошибок (m). Достоверность различий рассчитывали с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

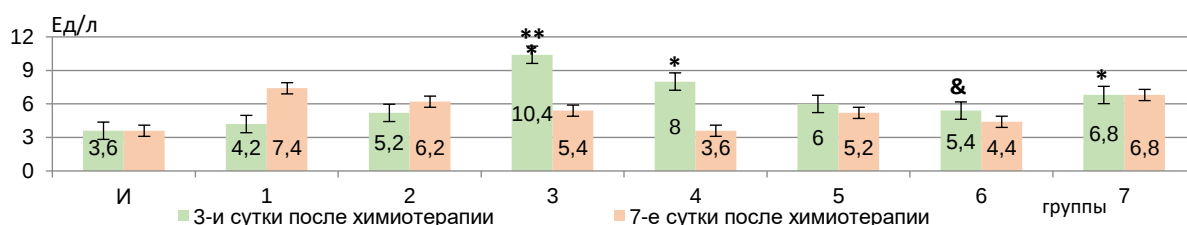
В 3 группе через 3 дня после введения Л «Д-Ц» активность АЛТ снижалась на 53,5% ($p < 0,05$) относительно интактных крыс и на 56% ($p < 0,05$) – относительно В «Д-Ц» (2 группы), а спустя 7 дней была на 32,5% ниже интактного уровня ($p < 0,05$, рис. 1, А). Активность АСТ при этом не изменялась во всех группах с животными (рис. 1, Б).



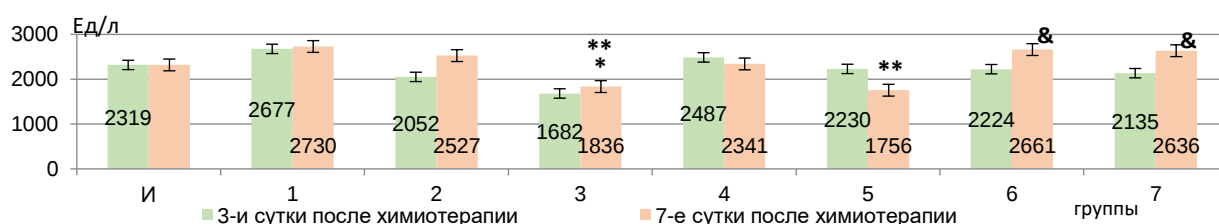
А. АЛТ



Б. АСТ



В. ГГТ



Г. ЛДГ

Рис. 1. Изменения активности сывороточных АЛТ, АСТ, ГГТ и ЛДГ у животных с У-256 после введения ксимедона (водного, липосомного) и доксорубина с циклофосфамидом, заключенных в липосомальные наночастицы (А-Г)

Примечание: здесь и далее представлены средние значения показателей и стандартная погрешность, *- статистически значимо к интактным крысам, ** - статистически значимо к группе 2; &- статистически значимо к группе 3 ($p < 0,05$). И – интактные крысы; 1 – У-256; 2 – В «Д-Ц»; 3 – Л «Д-Ц»; 4 – ВРК 50 мг/кг; 5 – ВРК 100 мг/кг; 6 – ЛФК 50 мг/кг; 7 – ЛФК 100 мг/кг. Составлен авторами на основе собственных данных.

ВРК (100 мг/кг) у крыс из 5 группы через 3 дня от начала введения после инъекции Л «Д-Ц» препятствовал снижению активности АЛТ (прирост на 86% к 3 группе, $p < 0,05$), однако, через 7 дней активность АЛТ все же снижалась на 29% к интактной уровню.

ЛФК в дозе 50 мг/кг только через 7 дней после введения Л «Д-Ц» восстанавливал активность АЛТ (прирост на 31% к 3 группе, $p < 0,05$), а в дозе 100 мг/кг – препятствовал снижению активности АЛТ уже на 3 день после инъекции Л «Д-Ц» (прирост на 58% при сравнении с 3 группой, $p < 0,05$, рис. 1, А).

В 3 группе через 3 дня после введения Л «Д-Ц» активность ГГТП повышалась в 2,8 раза ($p<0,01$) относительно интактных крыс и в 2 раза ($p<0,05$) – относительно В «Д-Ц» (2 группы), а через 7 дней не отличалась от интактного уровня (рис. 1, В).

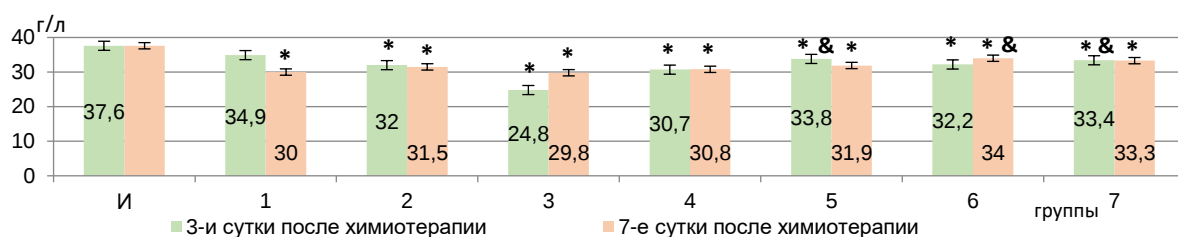
ВРК только в дозе 100 мг/кг сохранял активность ГГТП на уровне показателя параметра в обеих временных точках оценивания.

ЛФК 50 мг/кг уже на 3 сутки после введения Л «Д-Ц» снижал активность ГГТП на 48% ($p<0,05$) и в дальнейшем, на 7 сутки, она сохранялась на первоначальном уровне. Доза 100 мг/кг ЛФК не препятствовала росту активности ГГТП на 3 день после введения Л «Д-Ц» – активность была выше на 89% ($p<0,05$) при сравнении с интактными крысами, и сохранялась такой же к 7 суткам (рис. 1, В).

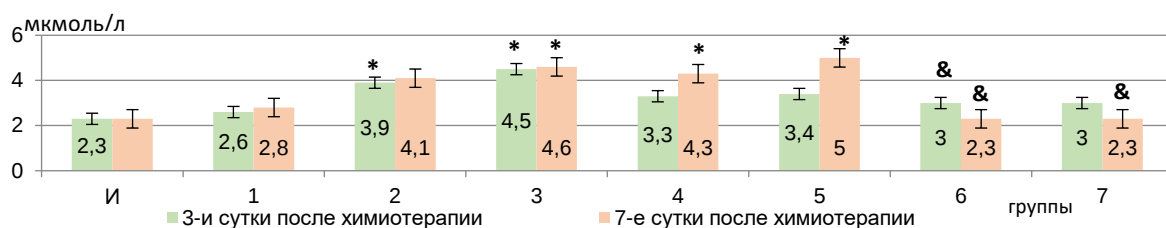
Активность ЛДГ снижалась в 3 группе через 3 дня после введения Л «Д-Ц» на 27,4% в сравнительном аспекте с интактными животными, а к 7 дню была еще и ниже показателя у 2 группы на 27% ($p<0,01$, рис. 1, Г).

Обе вводимых дозы ЛФК к 7 суткам после применения Л «Д-Ц» восстанавливали активность ЛДГ до интактного уровня (рис. 1, Г).

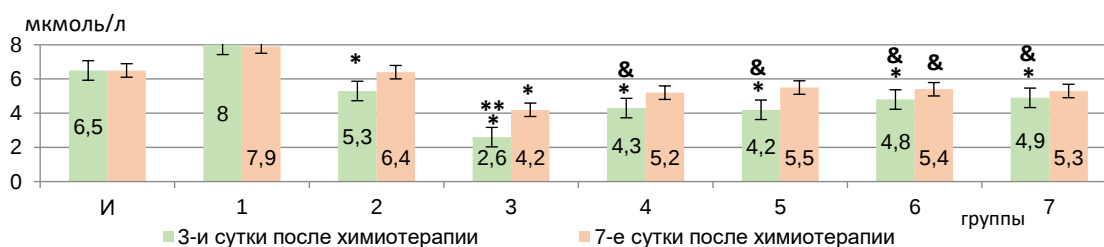
Через 3 дня после введения Л «Д-Ц» уровень альбуминов снижался на 34% к интактным крысам, через 7 дней – на 21% ($p<0,05$, рис. 2, А).



А. Альбумины



Б. Билирубин общий



В. Мочевина

Рис. 2. Изменения в уровне сывороточных альбуминов, билирубина общего и мочевины у животных с У-256 после введения ксимедона (водного, липосомного) и доксорубицина с циклофосфамидом, заключенных в липосомальные наночастицы (А-В).

Составлен авторами на основе собственных данных

ВРК и ЛФК в дозе 100 мг/кг через 3 дня от начала введения после инфузии Л «Д-Ц» одинаково наращивали уровень альбуминов по сравнению с 3 группой (прирост на 35-36%, $p < 0,05$), однако, к 7 суткам уровень альбуминов в сыворотке крови статистически значимо нарастал к показателю 3 группы на 14% только в 6 группе крыс на фоне ЛФК (50 мг/кг) (рис. 2, А).

Общий билирубин нарастал после введения Л «Д-Ц» через 3 и 7 дней на 96% и 99% соответственно относительно интактных крыс ($p < 0,05$). ЛФК, в отличие от ВРК, в обеих дозах снижал уровень билирубина общего и через 7 дней он возвращался к исходному (был в 2 раза меньше, чем в 3 группе, рис. 2, Б).

Концентрация мочевины через 3 дня после введения Л «Д-Ц» была ниже в 2,5 раза ($p < 0,001$) относительно интактных крыс и в 2 раза ($p < 0,01$) – относительно В «Д-Ц», а через 7 дней – на 35% ниже относительно интактных крыс ($p < 0,05$, рис. 2, В). ВРК и ЛФК в обеих исследуемых дозах одинаково эффективно корректировали уровень мочевины на 3 (прирост на 63-69% на фоне водного раствора и на 86-90% на фоне липосомной формы) и 7 сутки после введения цитостатических средств в липосомной форме.

Следовательно, доксорубин и циклофосфамид, инкапсулированные в липосомальные частицы, оказывают более выраженное токсическое действие на печень, чем введение их водного раствора, и это находит свое отражение в подавлении синтетической функции печени (нарушения в метаболизме белков и свободных аминокислот и их синтеза, а также синтеза мочевины), проявляясь не только в виде уменьшения уровня альбуминов и мочевины, но и снижения активности АЛТ и ЛДГ, а также росте маркеров холестаза – активности ГГТП и общего билирубина. Отсутствие роста активности аминотрансфераз и ЛДГ в крови, по нашему мнению, может объясняться не только угнетением биосинтетической функции клеток печени, но и вероятной сохранностью мембран гепатоцитов, поскольку доксорубин и циклофосфамид вызывают повреждение гепатоцитов в основном через индукцию перекисного окисления липидов и апоптоза, а не некроза [13, 14]. Снижение активности аминотрансфераз на фоне токсического поражения печени соединениями с противоопухолевой активностью отмечалось и в работе Додоховой М.А. и соавт. [15].

Ксимедон в обеих вводимых формах в дозе 50 мг/кг препятствует снижению активности АЛТ и ЛДГ через 3 дня после использования цитостатических средств в липосомах

(статистически значимая нормализация их активности к 7 суткам – при использовании формы липосом). Ксимедон, инкапсулированный внутри липосом, в отличие от его водного раствора, в дозе 100 мг/кг дольше препятствует снижению активности АЛТ и ЛДГ, а в дозе из расчета 50 мг/кг – статистически значимо повышает на 7 сутки уровень альбуминов в крови. Содержание мочевины в крови корректируется обеими используемыми формами ксимедона. Активность ГГТП снижается на 3 сутки только при использовании липосом, содержащих 50 мг/кг ксимедона. Его водный раствор оказывает временный эффект по сдерживанию роста уровня общего билирубина в крови – только на 3 сутки, а в виде липосом – в обеих дозах снижает его уровень дольше (в дозе 50 мг/кг – быстрее – на 3 сутки). Все это говорит о более выраженном гепатопротекторном эффекте инкапсулированного в липосомальные частицы ксимедона, и наиболее сбалансированный корректирующий эффект отмечается на дозе 50 мг/кг. Вероятно, липосомная форма оптимизирует реализацию гепатопротекторного действия ксимедона, что более эффективно позволяет корректировать биосинтетическую функцию печени и проявления холестаза в меньшей дозе. Возможно, целенаправленная доставка с помощью липосом позволяет ксимедону накапливаться в высоких концентрациях в клетках печени и митохондриях, эффективнее защищая их от повреждения [16].

Заключение. Таким образом, разбалансировка активности АЛТ, ЛДГ (их снижение) и ГГТП (повышение) в сочетании со снижением концентрации альбуминов, мочевины и ростом уровня общего билирубина в сыворотке крови после введения в вену антрациклинового антибиотика доксорубина и алкилирующего цитостатика циклофосфида, инкапсулированных совместно в липосомальные частицы, отражает усиление дисфункции печени и отчетливо проявляется уже к 3 суткам после их введения.

Коррекция наибольшего числа измененных показателей функционального состояния печени (АЛТ, ГГТП, ЛДГ, альбумины, мочевина, общий билирубин) отмечается при внутривенном введении ксимедона, инкапсулированного в липосомальные частицы, в дозе 50 мг/кг. В этой указанной форме и дозе он обладает наибольшим потенциалом гепатопротекторного воздействия относительно его водорастворимой формы. Доза 100 мг/кг инкапсулированного в липосомальные частицы ксимедона не обладает превосходством над дозой 50 мг/кг в коррекции функционального состояния печени при использовании комбинации цитостатических средств в липосомах.

Список литературы

1. Горбик В.С., Шпрах З.С., Козлова Ж.М., Салова В.Г. Липосомы как система таргетной доставки лекарственных средств // Российский биотерапевтический журнал. 2021. Т. 20. №1.

С. 33-41. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-33-41.

2. Бурдаев Н.И., Николаева Л.Л., Косенко В.В., Шпрах З.С., Бунятян Н.Д. Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2023. Т. 13. №2-1. С. 316-332. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-508.
3. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л., Каркищенко Н.Н. Липосомированная форма экстракта препуциальной железы кабарги – новое средство адаптогенного действия // Биомедицина. 2019. Т. 15. №4. С. 34-45. DOI: 10.33647/2074-5982-15-4-34-45.
4. Дмитриева М.В., Тимофеева Т.А., Оборотова Н.А., Краснюк И.И., Степанова О.И. Характеристика и оценка стабильности липосомальных препаратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. Т. 24. №3. С. 36-44. https://www.pharmjournal.ru/jour/article/view/604?locale=ru_RU. EDN: OYVYLF.
5. Савельева М.И., Сычев Д.А. Возможности трансдермальных систем доставки лекарственных средств, применяемых при хронических заболеваниях вен // Флебология. 2018. №1. С. 40-49. DOI: 10.17116/flebo201812140-49.
6. Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaer W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications // Heliyon. 2022. Vol. 8. Is. 5. P. e09394. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09394.
7. Tabassum A., Satoko O., Mahadi H., Mizune O., Kentaro K. Protective effects of liposomes encapsulating ferulic acid against CCl4-induced oxidative liver damage in vivo rat model // Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2023. Vol. 72. Is 1. P. 46-53. DOI: 10.3164/jcbs.22-37.
8. Li M., Wang L., Du J. Clinical observation of liposomal doxorubicin on liver and renal function in patients with breast cancer // Toxicol Res (Camb). 2023. Vol. 12. Is. 5. P. 807-813. DOI: 10.1093/toxres/tfad072.
9. Alhusaini A. M., Alanazi A. M., Fadda L. M., Alqahtani Q. H., Sarawi W. S., Hasan I. H. The beneficial efficacy of liposomal resveratrol against doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats: Role of TGF- β 1 and SIRT1 // Journal of King Saud University – Science. 2021. Vol. 33. Is. 8. P.e101640. DOI: 10.1016/j.jksus.2021.101640.
10. Беляев Г.П., Выштакалюк А.Б., Парфенов А.А., Галяметдинова И.В., Семенов В.Э., Зобов В.В. Антифиброзный эффект производных пиримидина ксимедона и его конъюгата с L-аскорбиновой кислотой // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2023. Т. 165. №2. С. 175-189. DOI: 10.26907/2542-064X.2023.2.175-189.

11. Сипров А.В., Костина Ю.А. Сравнительная оценка изменения показателей перекисного окисления липидов и системы глутатиона в тканях печени крыс с карциномой Walker-256 при использовании производных пиримидина и 3-гидроксипиридина в сочетании с доксорубицином и паклитакселом // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2014. № 3. С. 30-38.
12. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research (ILAR); Division on Earth and Life Studies (DELS); National Research Council of the national academies. Washington: The National Academies Press, 2011. 246 p.
13. Zobeydi A.M., Mousavi Namavar S.N., Sadeghi Shahdani M., Choobineh S., Kordi M.R., Rakhshan K. Mitigating doxorubicin-induced hepatotoxicity in male rats: The role of aerobic interval training and curcumin supplementation in reducing oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis // Sci Rep. 2025. Vol. 15. Is. 1. P. e6604. DOI: 10.1038/s41598-025-91133-6.
14. Jali A.M., Alam M.F., Hanbashi A., Mawkili W., Abdlasaed B.M., Alshahrani S., Qahl A.M., Alrashah A.S.S., Shahi H.A. Sesamin's Therapeutic Actions on Cyclophosphamide-Induced Hepatotoxicity, Molecular Mechanisms, and Histopathological Characteristics // Biomedicines. 2023. Vol. 11. Is. 12. P. e3238. DOI: 10.3390/biomedicines11123238.
15. Додохова М.А., Воронова О.В., Котиева И.М., Сафроненко А.В., Шлык С.В., Дроботя Н.В., Акименко М.А., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р. Сравнительный анализ морфологических и биохимических изменений при однократном внутрижелудочном введении гибридных оловоорганических соединений // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. 2023. Т. 38. №1. С. 167-174. DOI: 10.29001/2073-8552-2023-38-1-167-174.
16. Jiang Q., Yin J., Chen J., Ma X., Wu M., Liu G., Yao K., Tan B., Yin Y. Mitochondria-Targeted Antioxidants: A Step towards Disease Treatment // Oxid Med Cell Longev. 2020. Is. 1. P. e8837893. DOI: 10.1155/2020/8837893.